

B164

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 9/99, 5/10, C12Q 1/34, C12N 15/55, G01N 33/15 // A01K 67/027</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/50453</p> <p>(43) 国際公開日 1999年10月7日(07.10.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01546</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月26日(26.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/78859 1998年3月26日(26.03.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 穴澤秀治(ANAZAWA, Hideharu)(JP/JP) 〒178-0064 東京都練馬区南大泉4-19-18 Tokyo, (JP) 加藤容子(KATO, Yoko)(JP/JP) 〒194-0032 東京都町田市本町田1392-5-202 Tokyo, (JP) 石田浩幸(ISHIDA, Hiroyuki)(JP/JP) 〒411-0945 静岡県駿東郡長泉町本宿542-1-106 Shizuoka, (JP) 中田泰介(NAKATA, Taisuke)(JP/JP) 〒411-0942 静岡県駿東郡長泉町中土狩498-10-101 Shizuoka, (JP)</p>	<p>秋永士朗(AKINAGA, Shiro)(JP/JP) 〒411-0943 静岡県駿東郡長泉町下土狩1334-6-301 Shizuoka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特 許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: METHOD FOR SEARCHING STEROID SULFATASE INHIBITORS</p> <p>(54)発明の名称 ステロイドサルファターゼ阻害剤の探索方法</p> <p>(57) Abstract A method for efficiently searching compounds capable of inhibiting steroid sulfatase activity and thus being useful in treating hormone-dependent diseases such as mammary cancer which comprises treating cells having a steroid sulfatase gene transferred thereinto with the compounds to be tested and then judging the proliferation of the cells.</p>		

(57)要約

ステロイドサルファターゼ遺伝子導入細胞に、探索すべき化合物を作用させ、当該細胞の増殖抑制の有無を判定することにより乳癌等のホルモン依存性の疾病等の治療に有用なステロイドサルファターゼ活性を阻害する化合物を効率よく探索することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

ステロイドサルファターゼ阻害剤の探索方法

技術分野

本発明は、乳癌等のホルモン依存性の疾病の治療を目指し、ステロイドホルモン生合成に関与するステロイドサルファターゼ活性を阻害する化合物の探索方法を提供する。

背景技術

ホルモン依存性の癌において、抗ホルモン剤が効果を持つことは古くから知られており、抗男性ホルモン剤や抗女性ホルモン剤が用いられてきた。近年、抗ホルモン剤であるタモキシフェンがホルモン依存性癌に対する抗癌剤として開発されている（The role of Tamoxifen in Breast Cancer ; Iacobelli, S.ら、Raven Press, NY, 1982年）。ステロイドホルモン生合成、とくにエストロジェン生合成には、アンドロステンジオン (androstenedione) からエストロン (estrone) に至るアロマターゼ (aromatase) 経路とエストロン-サルフェート (estrone-sulfate) からエストロン (estrone) にいたるサルファターゼ (sulfatase) 経路とが知られている。その中で、アロマターゼ経路を抑えることでエストロン生合成を低下させるアロマターゼ阻害剤の開発研究は、近年、急速に進展している。

例えば、アロマターゼ酵素遺伝子を導入した細胞を用い、細胞増殖の阻害 [Cancer Res., 50, 6949 (1990) ; J. Steroid Biochem., 44, 611 (1993) ; 特表平 4-502261] やアロマターゼ遺伝子を導入した細胞をヌードマウスに移植して樹立した腫瘍の体積の縮小を指標にした探索系 [Cancer Res., 55, 3077 (1995)] が報告されている。

しかしながら、ステロイドホルモン生合成系の解析研究が進展するにつれて、アロマターゼ経路より、ステロイドサルファターゼ経路の方がエストロン生合成経路上、重要な役割を担うということが明らかになってきた [J. Clin. Endocrinol. Metab., 59, 29 (1984) ; Ann. NY Acad. Sci., 464, 126 (1986) ; J. Steroid Biochem., 34, 155 (1989)] 。

ステロイドサルファターゼについては、ステロイドサルファターゼを

多く含有するヒト胎盤よりステロイドサルファターゼを分画・調製し、その酵素活性分画を用いたアッセイ系で、阻害剤を探索する試みが、近年報告されている [Steroids, 58, 106 (1993); J. Steroid Biochem., 48, 523 (1994); J. Steroid Biochem., 59, 41 (1996); Biochemistry, 36, 2586 (1997)]。分画酵素に対する阻害活性だけではなく、ホルモン依存性の生育を示す細胞に対する生育の阻害によって、ステロイドサルファターゼの阻害剤を探索、評価することも報告されている [J. Steroid Biochem., 59, 83 (1996); Cancer Res., 57, 702 (1997)]。また、ステロイドサルファターゼ遺伝子については、ヒト由来のものが知られている [J. Biol. Chem., 23, 13865 (1989)]。

しかしながら、分画酵素を用いた探索系及びホルモン依存性の生育を示す細胞を用いた探索系は、感度の点において十分ではない。また、実際の病態に近い系として、動物を用いる探索系が求められている。

発明の開示

本発明の目的は、乳癌等のホルモン依存性疾病の治療に有用なステロイドサルファターゼ活性を阻害する化合物を効率良く探索する方法を提供することにある。

本発明は、ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞の増殖を抑制することを指標とするステロイドサルファターゼ阻害剤の探索方法に関する。さらに詳しくは、ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞に、探索すべき化合物を作用させ、当該細胞の増殖抑制の有無を判定することによりステロイドサルファターゼ阻害剤を探索する方法に関する。また、本発明はステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞を動物に移殖した後に、探索すべき化合物を当該動物に作用させ、当該細胞の増殖抑制の有無を判定することによりステロイドサルファターゼ阻害剤を探索する方法に関する。さらに、本発明は、当該探索方法により得られるステロイドサルファターゼ阻害剤に関する。但し、既知のステロイドサルファターゼ阻害剤は上記の本発明の一態様であるステロイドサルファターゼ阻害剤より除かれる。

本発明に用いられる遺伝子としては、ステロイドサルファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であればいずれでも用いることができる。例えば、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする遺伝子、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列の一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつステロイドサルファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子等が挙げられる。

ポリペプチドの有するアミノ酸配列のうち一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつステロイドサルファターゼ活性を有するポリペプチドは、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、WO85/00817、Nature, 316, 601 (1985)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Current Protocols in Molecular Biology, 8 章, Mutagenesis of Cloned DNA, John Wiley & Sons, Inc., 1989 年等に記載の方法に準じて調製することができる。

本発明に用いられるステロイドサルファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の具体例としては、例えば、配列番号 2 で表される塩基配列を含む DNA、またはこれら DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつステロイドサルファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA 等が挙げられる。

上記ストリンジентな条件下でハイブリダイズ可能な DNA とは、ステロイドサルファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロット・ハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味する。具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0M の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶

液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することによって同定できる DNA 等が挙げられる。例えば、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA の塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有する DNA、好ましくは 80%以上の相同性を有する DNA、さらに好ましくは 95%以上の相同性を有する DNA 等が挙げられる。

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第 2 版、Sambrook, Fritsch, Maniatis 編集, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 年(以下、Molecular Cloning 第 2 版と略記する)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

本発明のステロイドサルファターゼ遺伝子を導入する宿主細胞は、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入することができ、ステロイドサルファターゼを発現できるものであれば如何なる細胞でも用いられるが、ホルモン依存性の増殖を示す細胞が好ましく用いられる。

本発明のステロイドサルファターゼのうち、ヒト由来のものは翻訳後修飾が活性発現に必須であることが報告されており [Cell, 82, 271 (1998)]、この場合は宿主細胞として動物細胞を用いる。宿主細胞として用いられる動物細胞としては、例えば、ナマルバ細胞、HBT5637 (特開昭 63-299)、COS1 細胞、COS7 細胞、CHO 細胞等が挙げられる。また、マウス等の動物にステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞を移植し、生着させ、腫瘍を形成させる場合には、ホルモン依存的な生育を示し、動物に生着、腫瘍形成しやすい細胞を用いる。例えば、MCF-7 [Int. J. Cancer, 54, 119 (1993)]、T47D [J. Clin. Endocrinol., 55, 276 (1982)]、Ishikawa 株 [J. Steroid Biochem., 24, 85 (1986)] 等が用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、宿主細胞において、自立複製ができるか、または、染色体中への組み込みができ、

ステロイドサルファターゼ遺伝子を転写できる位置に、プロモーターを含有しているものが用いられる。例えば、pcDNA1、pcDNA3、pcDM8（ともに Invitrogen 社製）、pAGE107 [特開平 3-22979 ; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3（特開平 2-227075）、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp（Invitrogen 社製）、pREP（Invitrogen 社製）、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)] 等が挙げられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであれば何れでも用いられる。例えば、サイトメガロウイルス（ヒト CMV）の IE（immediate early）遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、メタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等が挙げられる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞に DNA を導入できるいかなる方法も用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法（特開平 2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)] 等の方法を用いることができる。形質転換細胞の取得および培養は、特開平 2-227075 号公報あるいは特開平 2-257891 号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York, 1992 年、; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 38, 28, Unit16.9, 16.11, John Wiley and Sons, New York, 1995 年 ; Bio/Technology, 6, 47 (1998)等に記載された方法によって、ステロイドサルファターゼを昆虫細胞で発現させることができる。即ち、ステロイドサルファターゼ遺伝子導入ベクターとバキュロウイルスとを昆虫細胞に共導入して当該昆虫細胞を培養し、得られた培養液の上清中から組換えウイルスを得

た後、当該組換えウイルスを昆虫細胞に感染させることにより、ステロイドサルファターゼを昆虫細胞で発現させることができる。

該方法において用いられるベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともに Invitrogen 社製）等が用いられる。バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

宿主として用いる昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞である Sf9、Sf21（*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York, 1992 年）、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞である High5（Invitrogen 社製）等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターとバキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平 2-227075）、リポフェクション法 [*Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **84**, 7413 (1987)] 等が挙げられる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13（ATCC37115）、YEp24（ATCC37051）、YCp（ATCC37419）等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであれば何れでも用いられる。例えば、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal1 プロモーター、gal10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MFα1 プロモーター、CUP1 プロモーター等のプロモーターが挙げられる。

宿主細胞として用いられる酵母菌株としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルピウス (*Schwanniomyces*

alluvius) 等が挙げられる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であれば何れでも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 75, 1929 (1978)] 等が用いられる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを発現させることができる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合には、当該細胞がステロイドサルファターゼ遺伝子発現ベクターを自立複製させることができ、且つ当該発現ベクターが、プロモーター、リボソーム結合配列、ステロイドサルファターゼをコードする DNA、転写終結配列より構成されていることが好ましい。また、当該ベクターには、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (ともにベーリンガーマンハイム社製)、pSE280 (Invitrogen 社製)、pGEMEX-1 (Promega 社製)、pQE-8 (QIAGEN 社製)、pKYP10 (特開昭 58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 82, 4306 (1985)]、pBluescript (STRATAGENE 社製)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平 3-22979、米国特許第 4686191 号、米国特許第 4939094 号、米国特許第 5160735 号)、pKK233-2 (Pharmacia 社製)、pGEX (Pharmacia 社製)、pET システム (Novagen 社製)、pUB110 [Recombinant DNA Techniques (1983), Addison-Wesley Pub. Co.に記載]、pSupex 等が用いられる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであれば何れでも用いられる。例えば、trp プロモーター (Ptrp)、lac プ

ロモーター (Plac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{letI}プロモーター、P_{SE}プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等が用いられる。また、P_{trp}を2つ直列させたプロモーター (P_{trpx2})、lacプロモーターのように人為的に設計、改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミッドが好ましく用いられる。

本発明のステロイドサルファターゼ遺伝子の発現には、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞として用いる原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する微生物、例えば、

Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia marcescens OUT8259、Pseudomonas putida ATCC12633、Bacillus subtilis ATCC33677、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354 等が用いられるが、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000 等が好ましく用いられる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入す

る方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 [特開昭 63-2483942; Gene, 17, 107 (1982); Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] 等の方法が用いられる。

上記宿主細胞にステロイドサルファターゼ遺伝子を導入するには、Molecular Cloning 第2版や Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~34, John Wiley and Sons, New York, 1995 年等に記載された方法を用いることができる。即ち、制限酵素、または DNA 分解酵素で、ステロイドサルファターゼをコードする DNA を消化し、得られたステロイドサルファターゼをコードする DNA を含む DNA 断片を、発現ベクター中のプロモーター下流に挿入する。次に、この DNA を挿入した発現ベクターを宿主細胞中に導入し、ステロイドサルファターゼ遺伝子を含む発現ベクターが導入された形質転換細胞を選択する。

ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入された細胞の選択は、発現ベクター上にコードされているマーカー遺伝子の活性の発現とステロイドサルファターゼ活性の向上を指標に行う。ステロイドサルファターゼ活性の測定方法は、Reed らの方法 [Int. J. Cancer, 50, 901 (1992)] に準じて行う。

動物細胞を宿主として得られた形質転換細胞を培養する培地としては、当該動物細胞が資化し得る培地であれば何れでも用いられるが、例えば、一般に動物細胞の培養用として使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、イーグル (Eagle) の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] または、これらの培地に牛胎仔血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常 pH 6~8、30~40℃、5% 炭酸ガス存在下で 1~7 日間行われる。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

細胞のホルモン依存性の生育を検証するためには、培地中に添加する牛胎仔血清はステロイドを含有しないものが用いられる。例えば、牛胎仔血清を活性炭処理し、血清中よりステロイド系化合物を除去したものが用いられる。また、市販の、例えば、Steroid-free calf serum (Hyclone 社製、CA) 等も用いられる。

形質転換細胞の選択マーカーは、それぞれの発現ベクター上にコードされている選択マーカーを用いる。例えば、ハイグロマイシン (Hygromycine)、G418、メトトレキサート (methotrexate) 等の選択マーカーが用いられる。これらの選択マーカーの発現により形質転換細胞が薬剤に対し耐性となることを利用し形質転換細胞を選択することができる。また、グルタミン合成酵素等の酵素も選択マーカーとして用いられる。

次に、ステロイドサルファターゼ活性の上昇によって、形質転換細胞を選択する。活性の測定は、トリチウムラベルしたエストロン-3-サルフェートがエストロンに変換され、トルエン抽出画分に転溶されることを指標として行う Vaccaro らの方法 [Enzyme, 37, 115 (1987)] または Reed らの方法 [Int. J. Cancer, 50, 901 (1992)] に従って行うことができる。また、本酵素活性は、エストロン-3-サルフェートの代わりに、合成基質である 4-メチルーウンベリフェリルサルフェート [4-methyl-umbelliferyl sulfate; Experimenta, 35, 309 (1979)] や p-ニトロフェニルサルフェート [p-nitrophenyl sulfate; Padiat. Res., 11, 894 (1977)] 等を用いても測定することができる。

ホルモン依存性の細胞増殖の検定は、エストロジェンを含まない培地で培養した細胞を、種々の濃度のエストロン-3-サルフェート、エストラジオール、エストロン等のエストロジェン化合物を含む培地に植継ぎ、培養後、各濃度のエストロジェン化合物存在下での細胞の生育を調べ、細胞生育のエストロジェン化合物に対する濃度依存性を調べることにより行うことができる。

上記エストロジェン化合物は、純度の高い試薬を用いるのが好ましい。とくにエストロン-3-サルフェートを用いる場合には、蒸留水に溶解

後、エーテルで2回以上抽出し、脂溶性不純物を除去したものを用いるのが好ましい。

本発明の形質転換細胞を培地に培養は、宿主の培養に通常用いられる方法に従って行うことができる。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換細胞を培養する培地としては、当該昆虫細胞が資化し得る培地であれば何れでも用いられるが、例えば、昆虫細胞培養用として一般に使用されている TNM-FH 培地（Pharmingen 社製）、Sf-900 II SFM 培地（GIBCO 社製）、ExCell400、ExCell405（いずれも JRH Biosciences 社製）、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., *Nature*, 195, 788 (1962)] 等が用いられる。培養は、通常 pH 6～7、温度 25～30℃で行われ、培養期間は、通常 1～5 日間である。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

大腸菌等の原核生物または酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換細胞を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換細胞の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

炭素源の具体例としては、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等が挙げられる。

窒素源の具体例としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等が挙げられる。

無機塩の具体例としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、

硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が挙げられる。

培養は、通常、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下行われる。培養温度は通常 15～40℃、培養時間は、通常 16～96 時間である。培養中 pH は 3.0～9.0 に保持する。pH の調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合には、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合には、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合には、インドールアクリル酸等をそれぞれ培地に添加してもよい。

ステロイドサルファターゼ阻害剤の探索は、上記で得られた形質転換細胞に、探索すべき化合物を作用させ、当該細胞の増殖抑制を判定することにより行うことができる。探索すべき化合物を作用させる形質転換細胞は、試験管内で培養されたものであっても、動物に移殖された細胞であってもよい。

試験管内で培養された細胞を用いる場合の探索は、以下のようにして行うことができる。

まず、試験管内で生存している形質転換細胞の数を計測した後に、探索すべき化合物を当該形質転換細胞に添加する。一定期間培養後、生存している細胞の数を計測し、探索すべき化合物を添加した細胞と無添加細胞との増殖率を比較することで当該化合物のステロイドサルファターゼ活性の有無を調べることができる。

動物に移殖された動物細胞を用いる場合の探索は、以下のようにして行うことができる。

まず、ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞をマウス等の

動物へ移植し、生着させ、腫瘍を形成させる。即ち、ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した腫瘍細胞を、免疫機能の低下したマウス、例えば、BALB/c-nu/nu（ヌードマウス）や SCID マウスに、 $1 \sim 5 \times 10^6$ 個、皮下に移植することにより腫瘍を形成させる。移植の際、生着率を向上させるために、接着因子を含む基底膜粗抽出液（例えば、マトリゲルベースメントメンブラン: Becton & Dickinson 社製）を混和してもよい [Br. J. Cancer, 67, 953 (1993)]。エストロジェン依存性乳癌に対しては、エストロジェン化合物を投与することで、生着率の向上や生着後の腫瘍の増殖を促進させることができる。

当該動物細胞を用いるステロイドサルファターゼ阻害剤の探索は、以下のようにして行うことができる。

腫瘍体積は、ノギスを用いて腫瘍の短径および長径を測定し、以下の近似式によって求めることができる。

$$\text{腫瘍体積} = (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 \div 2$$

エストロン-3-サルフェート投与後に増殖が認められた個体を選択し、探索すべき化合物を投与し、腫瘍体積を測定して、当該化合物のステロイドサルファターゼ阻害活性の有無を調べる。探索すべき化合物の投与ルートは静脈内、皮下、腹腔内あるいは経口のいずれでもよい。投与開始後から 3～4 日ごとに腫瘍体積を測定して、エストロン-3-サルフェート単独投与群とエストロン-3-サルフェートと探索すべき化合物とを投与した群との腫瘍増殖率を比較することで当該化合物のステロイドサルファターゼ活性の有無を調べることができる。

以下に実施例を示して、本発明の詳細を説明する。以下の実施例において、キットを使用した場合は、とくに明示しない限り、添付のプロトコールに従って実験を行った。

図面の簡単な説明

図 1 は親株および形質転換細胞株のステロイドサルファターゼ活性を示す。

図 2 は形質転換細胞株 T8S-2 および親株 T47D のエストロジェン化合

物に対する生育依存性の変化を示す。白四角はエストロン存在下、黒丸はエストラジオール存在下、黒四角はエストロン-3-サルフェート存在下での各細胞株の生育をそれぞれ示す。

図3は形質転換細胞株をマウスに移殖した後の腫瘍の体積の変化を示す。白四角はエストロン-3-サルフェート投与群を、黒丸は無処理群をそれぞれ示す。

図4はステロイドサルファターゼ阻害剤の抗腫瘍効果を示す。白丸は無処理群を、黒丸はエストロン-3-サルフェート投与群を、白三角はエストロン-3-サルフェートとステロイドサルファターゼ阻害剤C14とを同時に投与した群をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 ヒトステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞の造成

ヒト由来ステロイドサルファターゼ遺伝子（以下、STSと略す）を含むプラスミッド pSVL-STS [J. Biol. Chem., 264, 13865 (1989)] を制限酵素 XbaI 及び BamHI で消化し、得られた消化 DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、約 2.4 kb の STS を含む断片を切り出し、抽出した。本断片を、動物細胞用発現ベクター pAGE248 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)] の XbaI-BamHI サイトに挿入した後、本断片の挿入された各々のベクターを用い大腸菌（DH5α 株、GIBCO 社製）を形質転換した。これら形質転換体よりプラスミッド抽出キット（Qiagen 社製）を用いてプラスミッドを抽出し、pAGE248-STS を取得した。同様に上記本断片をサブクローニング用プラスミッド pBlueScriptIIISK(-)

（Stratagene 社製）の XbaI-BamHI サイトに挿入し、組換えプラスミッド pBS-STS を得た。この pBS-STS を NotI 及び XhoI で切断し、同様にして STS を含む断片を得た。この STS を含む断片を動物細胞用発現ベクター pcDNA3（Invitrogen 社製）の NotI-XhoI サイトに挿入し、発現プラスミッド pcSTS を作成した。

上記において組換えプラスミッドの調製のために、制限酵素切断、抽

出したベクターDNAを 100 ng、STS を含む DNA 断片を 100 ng 用いた。両 DNA は DNA ライゲーションキット ver.1 (Takara 社製) を用いて連結した。

これらの STS を含有するこれら発現プラスミッドを GenePulser (BioRad 社製) 装置を用い、0.2 cm 幅のキューベット (BioRad 社製) を使ったエレクトロポレーション法で、以下のようにして T47D および MCF7 細胞へ導入した。

遺伝子を導入する細胞は、RPMI1640 培地 (GIBCO 社製) に 10 %ウシ胎仔血清 (HyClone 社製)、 10^{-10} M のエストラジオール (Sigma 社製)、50 U/mL のペニシリン G (GIBCO 社製)、50 μ g/mL の硫酸ストレプトマイシン (GIBCO 社製) を添加した RPMI1640 培地で継代したものをを用いた。キューベット当たり 200 μ L の細胞懸濁液 (1.6×10^6 個の細胞を含む、137 nM 塩化カリウム、2.7 nM 塩化ナトリウム、8.1 mM リン酸一水素二ナトリウム、1.5 nM リン酸二水素一ナトリウム、4 mM 塩化マグネシウム緩衝液) に、4 μ g の発現プラスミッドを加え、0.30 kV、125 μ FD、パルス間隔 2.3~2.5 m 秒の条件でパルスをかけた。パルスをかけた後、キューベットを氷上に 5 分間静置した。キューベット中の細胞懸濁液を 10 mL の RPMI1640 培地 (10 %牛胎仔血清を含む) で希釈した。該希釈液を 96 ウェルプレート (Nunc 社製) に 100 μ L ずつ分注後、37℃ の 5 %炭酸ガス培養器中で培養した。1 日間培養後、pAGE 由来のベクターを導入した細胞に、300 μ g/mL となるようにハイグロマイシン B (Wako 社製) を添加し、pcDNA3 由来のベクター導入細胞に、G418 (Sigma 社製) を 0.6 mg/mL になるように添加し、さらに培養を続けた。3 週間培養後、培地を PRF-MEM 培地 [Eagles MEM 培地 (Nissui 社製) に 110 μ g/mL のビルビン酸ナトリウム、1×Non Essential amino acids (ICN 社製)、5 %ステロイド除去済み牛胎仔血清を添加した培地] に 10^{-10} M のエーテル抽出処理済みのエストロン-3-サルフェート (Sigma 社製) および 300 μ g/mL のハイグロマイシン B または 0.6 mg/mL の G418 を加えた培地に交換し、さらに培養を続けた。途中で希

釈し、継代を続け、遺伝子導入より7週間後に、ハイグロマイシン B または G418 に耐性を持ち、低濃度のエストロン-3-サルフェート存在下で生育する形質転換した細胞株を選択した。

上記で用いたステロイド除去牛胎仔血清は、以下のようにして作製した。

0.5 g の活性炭 (Wako 社製)、5 mg のデキストラン T-70 (Pharmacia 社製)、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 50 mL をよく混合し、室温で遠心分離して沈澱を回収し、デキストラン被覆活性炭を得た。これに、100 mL の牛胎仔血清を加え、45 °C で 30 分間保温し、遠心分離した上清を 0.1 μ m のフィルターで濾過滅菌し、これをステロイド除去牛胎仔血清とした。

エストロン-3-サルフェート (Sigma 社製、安定化剤として 30 % トリスを含む) は、微量含まれるエストロン化合物を除去するためにエーテル処理をしたものを用いた。具体的には、10 mM エストロン-3-サルフェート水溶液を 5 倍量のジエチルエーテルで 2 回抽出し、水層を凍結乾燥した。保存は -20 °C で行った。

実施例 2 形質転換細胞の選択

実施例 1 で得られた形質転換細胞のステロイドサルファターゼ活性を測定することにより STS が導入された細胞を以下のようにして選択した。

実施例 1 で選択された形質転換細胞を RPMI1640 培地で F25 フラスコ (Greiner 社製) を用いて培養した。細胞が培養容器の 60~80 % を埋めるほど生育したときに、培地を除き、細胞を生理的食塩水で洗浄し、血清を除いた 5 mL の PRF-MEM 培地に交換した。これに 5 pmol の [6,7-³H] エストロン-3-サルフェート (NEN 社製) を加え (終濃度 10⁻⁹ M)、5 % 炭酸ガス培養器中で 4 時間培養を行った。培養後、培養上清 1 mL を取り、トルエン 5 mL を加え、さらに内部標準として 4.5 × 10³ dpm の [4-¹⁴C] エストロンを加え、30 秒間よく攪拌した。その後 20 分間静置し、水層と有機溶媒層に分離した。溶媒画分を 2 mL とり、遠心

濃縮により 100 μ L まで濃縮した。OMNIFLUOR (NEN 社製) 4 g/L を含むトルエンをシンチレーターとして用い、該濃縮液中の ^3H 及び ^{14}C の放射活性を測定した。水溶性の基質である [6,7- ^3H]エストロン-3-サルフェートから、反応産物である脂溶性の [6,7- ^3H]エストロンへの変換率から、細胞の酵素活性を測定した。加えた内部標準を用いて、抽出効率を補正し、基質の変換量を求めた。その結果を図 1 に示した。図 1 において、T8S-2 細胞株は T47D 細胞株に pAGE248-STC プラスミッドを導入した形質転換細胞株、MCS-1 細胞株及び MCS-5 細胞株は MCF-7 細胞株に pcSTC プラスミッドをそれぞれ導入した形質転換細胞株、M8S-1 細胞株は MCF-7 細胞株に pAGE248-STC を導入した形質転換細胞株である。図 1 より明らかなように、STC を導入することにより 30 ~ 40 倍以上酵素活性が向上した細胞株が得られた。

実施例 3 ホルモン依存性生育の検証

親株である T47D 及び STC 導入形質転換株 T8S-2、それぞれを RPMI1640 培地で継代培養し、培養細胞が 5 cm シャーレの表面 80 % を埋めるくらい生育した時点で、培地をエストロジェンを含まない PRF-MEM 培地に交換した。5 %炭酸ガス培養器で 5 日間培養し、各々の細胞を EDTA-トリプシン溶液 (GIBCO 社製) で剥離した。これらの細胞を 96 ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェルとなるように播種し、種々の濃度のエストロン、エストラジオール、エストロン-3-サルフェートをそれぞれ添加した PRF-MEM 培地 100 μ L を加えて、5 %炭酸ガス培養器中で培養した (各エストロジェン化合物の最終濃度は、 10^{-13} ~ 10^{-7}M である)。7 日後、各ウェルに Alamar Blue 試薬 (BIO SOURCE 社製) 10 μ L を加え軽く混ぜた後、3 時間培養し、620 nm を対照として、560 nm の吸光度を測定し、細胞数の相対的な数値とした。

親株、形質転換細胞株について、各濃度のエストロジェン化合物を添加した培地での生育を示したのが図 2 である。図 2 において、T47D 株は親株であり、T8S-2 株は T47D 株に pAGE248-STC プラスミッドを導入した形質転換細胞株である。

図 2 に示したように、STS を導入した細胞は、親株より、1/10～1/100 ほど低濃度のエストロン-3-サルフェート存在下でも生育可能であった。親株にベクターのみを導入した株は親株と同じエストロゲン化合物依存性の生育を示した。このことは、ステロイドサルファターゼ阻害剤の探索を STS を導入した細胞の生育で検証する探索系は、低濃度の化合物で阻害の有無を判定できることを示している。

実施例 4 ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞を移植した後の腫瘍の形成

実施例 3 で得られた形質転換細胞株を RPMI1640 培地で継代培養後、EDTA-トリプシン溶液 (GIBCO 社製) で剥離し、RPMI1640 培地で洗浄した。この細胞を 2×10^8 個/mL になるように細胞濃度を調整し、等容量のマトリゲル-ベースメントメンブラン (Becton & Dickinson 社製) と混和した。これを 7～8 週齢、雌性、BALB/c-nu/nu (ヌードマウス、1 群 5 匹) の皮下に 0.1 mL (1×10^7 個) 移植した。移植当日および 2 週後にエストロゲン製剤 (EP デボ、帝国臓器社製) を筋肉内に投与した。腫瘍の生着が確認された個体を選択し、エストロゲン製剤の最終投与後、腫瘍の増殖が停止した時点から、エストロン-3-サルフェートを 0.1 mg/kg、毎日、皮下投与した。エストロン-3-サルフェート投与後の形質転換細胞株の造腫瘍性を示したのが図 3 である。エストロン-3-サルフェート非投与群では腫瘍は全く増殖せずに徐々に退縮し、消失するものも認められた。エストロン-3-サルフェート投与群では全例が増殖し、退縮した腫瘍は認められなかった。これらの結果から、ヌードマウス移植モデルにおいて、形質転換細胞株がエストロン-3-サルフェート依存的に増殖することが示された。

実施例 5 ステロイドサルファターゼ活性阻害剤の効果

実施例 4 で得られたエストロン-3-サルフェート依存的に増殖を示したマウスを、1 群 9 匹ずつ (1) 無処理群 (2) エストロン-3-サルフェート投与群 (3) エストロン-3-サルフェートおよびステロイドサルファターゼ阻害剤併用投与群に分けた。(2) の群にはエストロ

ン-3-サルフェート 0.1 mg/kg を、(3) の群にはエストロン-3-サルフェート 0.1 mg/kg とステロイドサルファターゼ阻害剤である化合物 C14 [Cancer Res., 57, 702 (1997)] 25 mg/kg とをそれぞれ 22 日間皮下投与した。腫瘍サイズの測定は、投与開始後 38 日目まで行なった。その結果を図 4 に示す。エストロン-3-サルフェート投与群は投与開始から 38 日目までに腫瘍体積が 1.4 倍に増加したが、無処理群はホルモン枯渇により腫瘍体積は 0.2 倍に退縮した。ステロイドサルファターゼ阻害剤をエストロン-3-サルフェートと同時に投与した時は、無処理群と同様な腫瘍退縮が認められた。

産業上の利用可能性

本発明により、乳癌等のホルモン依存性の疾病等の治療に有用なステロイドサルファターゼ活性を阻害する化合物を、効率よく探索することができる。

請求の範囲

- (1) ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞の増殖を抑制することを指標とするステロイドサルファターゼ阻害剤の探索方法。
- (2) ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞に、探索すべき化合物を作用させ、当該細胞の増殖抑制の有無を判定することによりステロイドサルファターゼ阻害剤を探索する請求の範囲(1)記載の方法。
- (3) ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞が、試験管中で培養された細胞である請求の範囲(1)または(2)記載の方法。
- (4) ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞が、動物に移殖された細胞である請求の範囲(1)または(2)記載の方法。
- (5) ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入した細胞を動物に移殖した後に、探索すべき化合物を当該動物に作用させ、当該細胞の増殖抑制の有無を判定することによりステロイドサルファターゼ阻害剤を探索する請求の範囲(1)記載の方法。
- (6) 動物がヒト以外の動物である請求の範囲(4)または(5)記載の方法。
- (7) 請求の範囲(1)～(6)記載の方法により得られるステロイドサルファターゼ阻害剤。
- (8) ステロイドサルファターゼ遺伝子を導入したステロイドホルモン依存性の増殖を示す細胞
- (9) 細胞が動物細胞である請求の範囲(8)記載の細胞。
- (10) 細胞が、T8S-2、MCS-1またはM8S-1から選ばれる細胞である請求の範囲(8)または(9)記載の細胞。

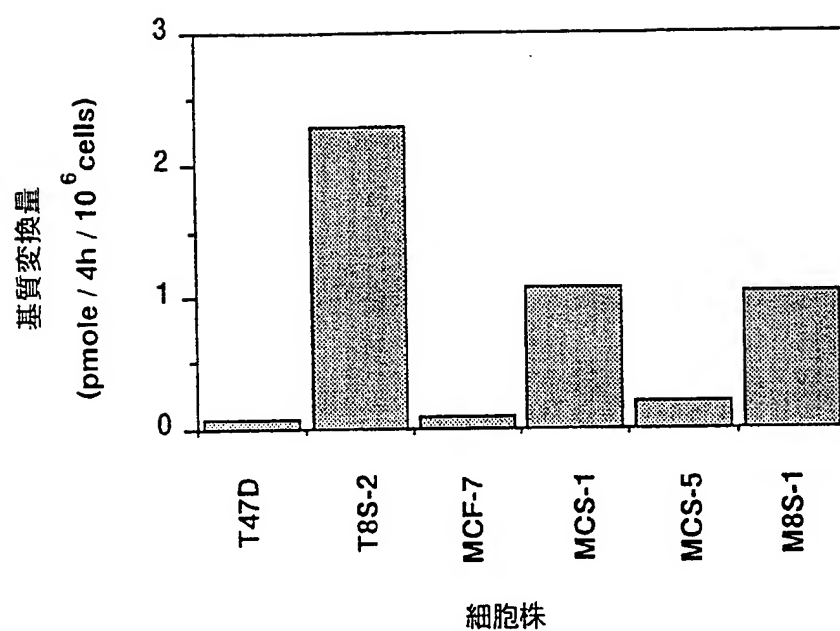


図1 形質転換細胞のステロイドサルファターゼ活性

T47D, MCF-7 : 親株

T8S-2, MCS-1, MCS-5, M8S-1 : 形質転換株

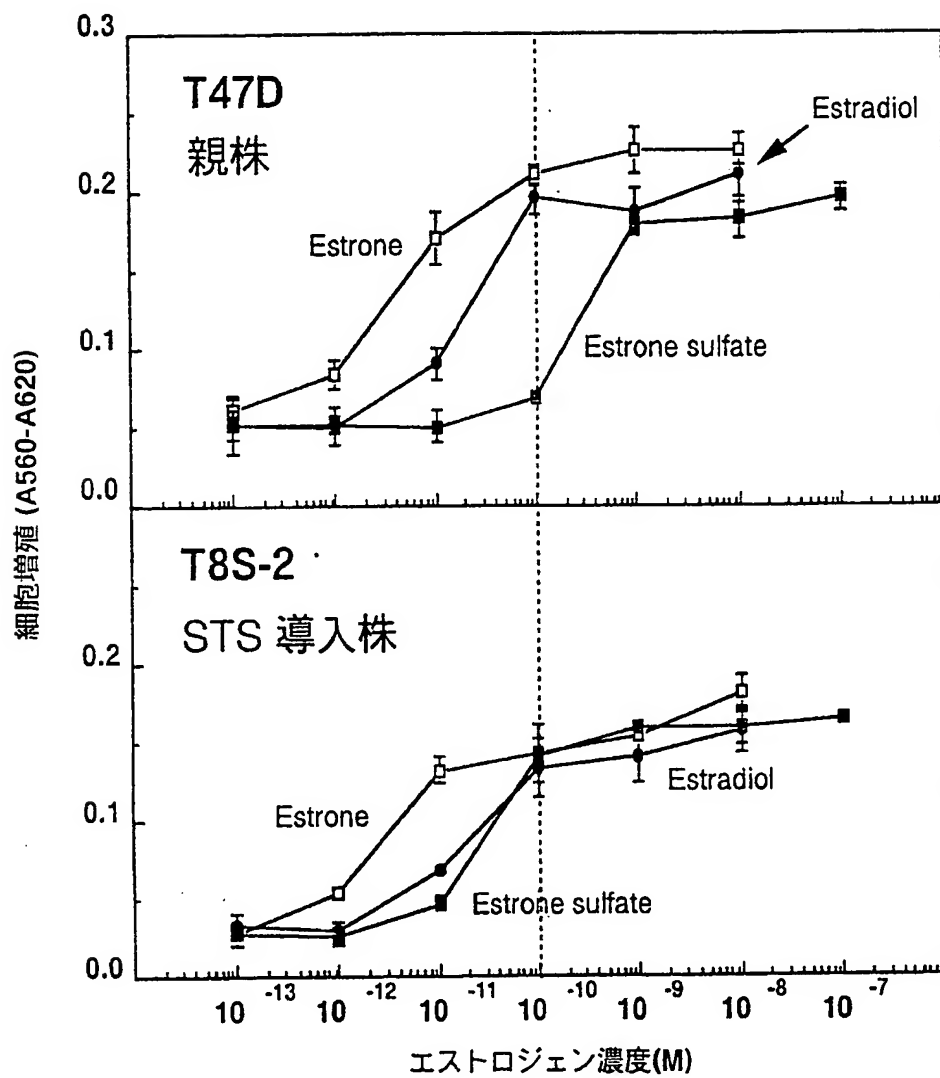


図2 形質転換細胞の各種 estrogen 類に対する生育依存性の変化

T47D: 親株

T8S-2: 形質転換株

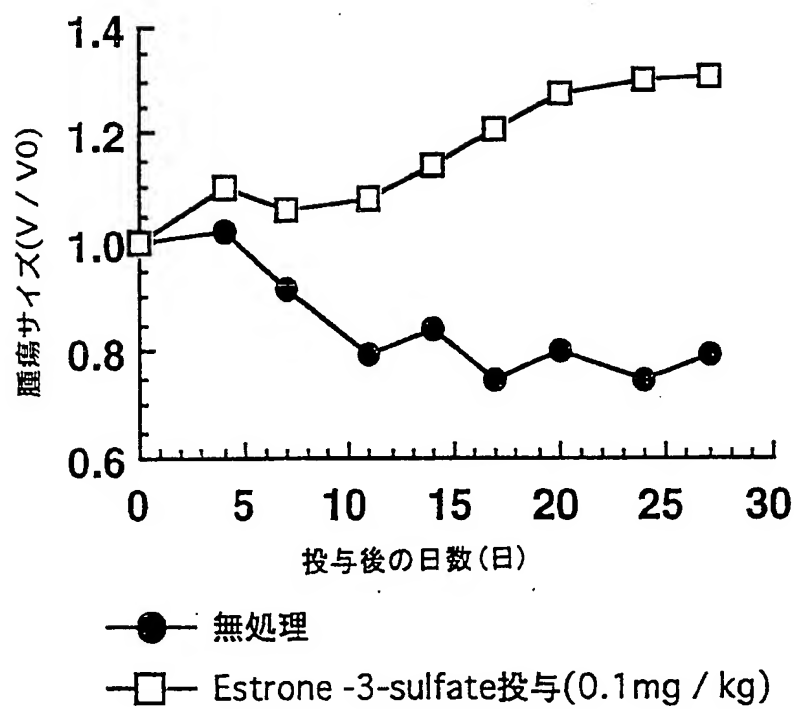


図3 ノードマウス移植形質転換細胞の腫瘍増殖性

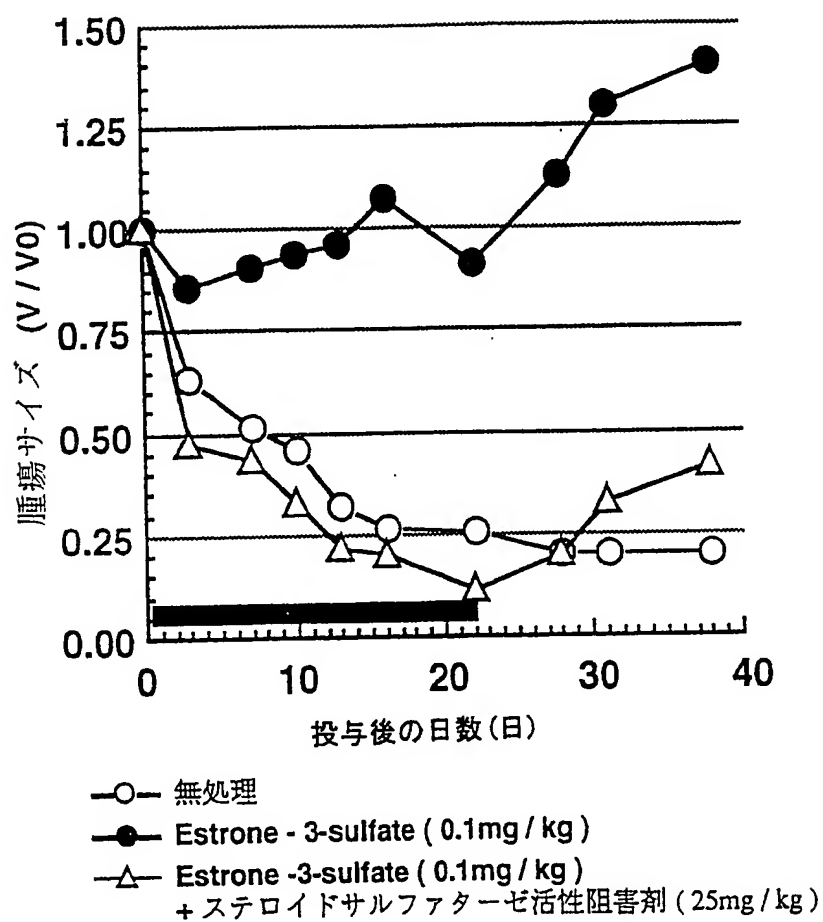


図4 ステロイドサルファターゼ活性阻害剤の抗腫瘍効果

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,

<120> A METHOD OF SCREENING FOR STEROID SULPHATASE INHIBITORS

<130> 11126W01

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 583

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Leu Arg Lys Met Lys Ile Pro Phe Leu Leu Leu Phe Phe Leu
1 5 10 15

Trp Glu Ala Glu Ser His Ala Ala Ser Arg Pro Asn Ile Ile Leu Val
20 25 30

Met Ala Asp Asp Leu Gly Ile Gly Asp Pro Gly Cys Tyr Gly Asn Lys
35 40 45

Thr Ile Arg Thr Pro Asn Ile Asp Arg Leu Ala Ser Gly Gly Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln His Leu Ala Ala Ser Pro Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala
65 70 75 80

Ala Phe Met Thr Gly Arg Tyr Pro Val Arg Ser Gly Met Ala Ser Trp
 85 90 95

Ser Arg Thr Gly Val Phe Leu Phe Thr Ala Ser Ser Gly Gly Leu Pro
 100 105 110

Thr Asp Glu Ile Thr Phe Ala Lys Leu Leu Lys Asp Gln Gly Tyr Ser
 115 120 125

Thr Ala Leu Ile Gly Lys Trp His Leu Gly Met Ser Cys His Ser Lys
 130 135 140

Thr Asp Phe Cys His His Pro Leu His His Gly Phe Asn Tyr Phe Tyr
 145 150 155 160

Gly Ile Ser Leu Thr Asn Leu Arg Asp Cys Lys Pro Gly Glu Gly Ser
 165 170 175

Val Phe Thr Thr Gly Phe Lys Arg Leu Val Phe Leu Pro Leu Gln Ile
 180 185 190

Val Gly Val Thr Leu Leu Thr Leu Ala Ala Leu Asn Cys Leu Gly Leu
 195 200 205

Leu His Val Pro Leu Gly Val Phe Phe Ser Leu Leu Phe Leu Ala Ala
 210 215 220

Leu Ile Leu Thr Leu Phe Leu Gly Phe Leu His Tyr Phe Arg Pro Leu
 225 230 235 240

Asn Cys Phe Met Met Arg Asn Tyr Glu Ile Ile Gln Gln Pro Met Ser
 245 250 255

Tyr Asp Asn Leu Thr Gln Arg Leu Thr Val Glu Ala Ala Gln Phe Ile
 260 265 270

Gln Arg Asn Thr Glu Thr Pro Phe Leu Leu Val Leu Ser Tyr Leu His
 275 280 285
 Val His Thr Ala Leu Phe Ser Ser Lys Asp Phe Ala Gly Lys Ser Gln
 290 295 300
 His Gly Val Tyr Gly Asp Ala Val Glu Glu Met Asp Trp Ser Val Gly
 305 310 315 320
 Gln Ile Leu Asn Leu Leu Asp Glu Leu Arg Leu Ala Asn Asp Thr Leu
 325 330 335
 Ile Tyr Phe Thr Ser Asp Gln Gly Ala His Val Glu Glu Val Ser Ser
 340 345 350
 Lys Gly Glu Ile His Gly Gly Ser Asn Gly Ile Tyr Lys Gly Gly Lys
 355 360 365
 Ala Asn Asn Trp Glu Gly Gly Ile Arg Val Pro Gly Ile Leu Arg Trp
 370 375 380
 Pro Arg Val Ile Gln Ala Gly Gln Lys Ile Asp Glu Pro Thr Ser Asn
 385 390 395 400
 Met Asp Ile Phe Pro Thr Val Ala Lys Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro
 405 410 415
 Glu Asp Arg Ile Ile Asp Gly Arg Asp Leu Met Pro Leu Leu Glu Gly
 420 425 430
 Lys Ser Gln Arg Ser Asp His Glu Phe Leu Phe His Tyr Cys Asn Ala
 435 440 445
 Tyr Leu Asn Ala Val Arg Trp His Pro Gln Asn Ser Thr Ser Ile Trp
 450 455 460

Lys Ala Phe Phe Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro Val Gly Ser Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Ala Thr His Val Cys Phe Cys Phe Gly Ser Tyr Val Thr His
 485 490 495

His Asp Pro Pro Leu Leu Phe Asp Ile Ser Lys Asp Pro Arg Glu Arg
 500 505 510

Asn Pro Leu Thr Pro Ala Ser Glu Pro Arg Phe Tyr Glu Ile Leu Lys
 515 520 525

Val Met Gln Glu Ala Ala Asp Arg His Thr Gln Thr Leu Pro Glu Val
 530 535 540

Pro Asp Gln Phe Ser Trp Asn Asn Phe Leu Trp Lys Pro Trp Leu Gln
 545 550 555 560

Leu Cys Cys Pro Ser Thr Gly Leu Ser Cys Gln Cys Asp Arg Glu Lys
 565 570 575

Gln Asp Lys Arg Leu Ser Arg
 580

<210> 2

<211> 2401

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (204).. (1952)

<400> 2

gcciccagca gctgacggga cccagctigia gtgaggttgc agtgattgag taggattggc 60

ctgcttcaaa gcagaggttt ctcattggaa tatgcttatt aaactccac tggtagcagaa 120

accatgaaca gaggatgaac aagtgaagtt gcaatctcct ccaacacagc tcagttcccc 180

aacaacagga tcacaagctg gag atg cct tta agg aag atg aag atc cct ttc 233

Met Pro Leu Arg Lys Met Lys Ile Pro Phe

1

5

10

ctc cta ctg ttc ttt ctg tgg gaa gcc gag agc cac gca gca tca agg 281

Leu Leu Leu Phe Phe Leu Trp Glu Ala Glu Ser His Ala Ala Ser Arg

15

20

25

ccg aac atc atc ctg gtg atg gct gac gac ctc ggc att gga gat cct 329

Pro Asn Ile Ile Leu Val Met Ala Asp Asp Leu Gly Ile Gly Asp Pro

30

35

40

ggg tgc tat ggg aac aaa act atc agg act ccc aat atc gac cgg ttg 377

Gly Cys Tyr Gly Asn Lys Thr Ile Arg Thr Pro Asn Ile Asp Arg Leu

45

50

55

gcc agt ggg gga gig aaa ctc act cag cac ctg gca gca tca ccg ctg 425

Ala Ser Gly Gly Val Lys Leu Thr Gln His Leu Ala Ala Ser Pro Leu

60

65

70

tgc aca cca agc agg gca gcc ttc atg act ggc cgg tac cct gtc cga 473

Cys Thr Pro Ser Arg Ala Ala Phe Met Thr Gly Arg Tyr Pro Val Arg

75

80

85

90

tca gga atg gca tct tgg tcc cgc act gga gtt ttc ctc ttc aca gcc 521

Ser Gly Met Ala Ser Trp Ser Arg Thr Gly Val Phe Leu Phe Thr Ala

95

100

105

tct tcg gga gga ctt ccc acc gat gag att acc ttt gct aag ctt ctg 569

Ser Ser Gly Gly Leu Pro Thr Asp Glu Ile Thr Phe Ala Lys Leu Leu

110

115

120

aag gat caa ggt tat tca aca gca ctg ata ggg aaa tgg cac ctt ggg	617
Lys Asp Gln Gly Tyr Ser Thr Ala Leu Ile Gly Lys Trp His Leu Gly	
125 130 135	
atg agc tgt cac agc aag act gac ttc tgt cac cac cct tta cat cac	665
Met Ser Cys His Ser Lys Thr Asp Phe Cys His His Pro Leu His His	
140 145 150	
ggc ttc aat tat ttc tat ggg atc tct ttg acc aat ctg aga gac tgc	713
Gly Phe Asn Tyr Phe Tyr Gly Ile Ser Leu Thr Asn Leu Arg Asp Cys	
155 160 165 170	
aag ccc gga gag ggc agt gtc ttc acc acg ggc ttc aag agg ctg gtc	761
Lys Pro Gly Glu Gly Ser Val Phe Thr Thr Gly Phe Lys Arg Leu Val	
175 180 185	
ttc ctc ccc ctg cag atc gtc ggg gtc acc ctc ctt acc ctt gct gca	809
Phe Leu Pro Leu Gln Ile Val Gly Val Thr Leu Leu Thr Leu Ala Ala	
190 195 200	
ctc aat tgt ctg ggg cta ctc cac gig cct cta ggc gtt ttt ttc agc	857
Leu Asn Cys Leu Gly Leu Leu His Val Pro Leu Gly Val Phe Phe Ser	
205 210 215	
ctt ctc ttc cta gca gcc cta atc ctg acc ctt ttc ttg ggc ttc ctt	905
Leu Leu Phe Leu Ala Ala Leu Ile Leu Thr Leu Phe Leu Gly Phe Leu	
220 225 230	
cat tac ttc cgg ccc ctg aac tgc ttc atg atg agg aac tac gag atc	953
His Tyr Phe Arg Pro Leu Asn Cys Phe Met Met Arg Asn Tyr Glu Ile	
235 240 245 250	
att cag cag ccc atg tcc tat gac aat ctc acc cag agg cta acg gig	1001
Ile Gln Gln Pro Met Ser Tyr Asp Asn Leu Thr Gln Arg Leu Thr Val	
255 260 265	

gag gcg gcc cag ttc ala cag cgg aac act gag act ccg ttc ctg ctt	1049
Glu Ala Ala Gln Phe Ile Gln Arg Asn Thr Glu Thr Pro Phe Leu Leu	
270 275 280	
gtc ttg tcc tac ctc cac gtg cac aca gcc ctg ttc tcc agc aaa gac	1097
Val Leu Ser Tyr Leu His Val His Thr Ala Leu Phe Ser Ser Lys Asp	
285 290 295	
ttt gct ggc aaa agt caa cac gga gtc tac ggg gat gct gtt gag gaa	1145
Phe Ala Gly Lys Ser Gln His Gly Val Tyr Gly Asp Ala Val Glu Glu	
300 305 310	
atg gac tgg agt gtg ggg cag atc ttg aac ctt ctg gat gag ctg aga	1193
Met Asp Trp Ser Val Gly Gln Ile Leu Asn Leu Leu Asp Glu Leu Arg	
315 320 325 330	
ttg gct aat gat acc ctc atc tac ttc aca tcg gac cag gga gca cat	1241
Leu Ala Asn Asp Thr Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Asp Gln Gly Ala His	
335 340 345	
gta gag gag gtg tct tcc aaa gga gaa att cat ggc gga agt aat ggg	1289
Val Glu Glu Val Ser Ser Lys Gly Glu Ile His Gly Gly Ser Asn Gly	
350 355 360	
atc tat aaa gga gga aaa gca aac aac tgg gaa gga ggt atc cgg gtt	1337
Ile Tyr Lys Gly Gly Lys Ala Asn Asn Trp Glu Gly Gly Ile Arg Val	
365 370 375	
cca ggc atc ctt cgt tgg ccc agg gtg ata cag gct ggc cag aag att	1385
Pro Gly Ile Leu Arg Trp Pro Arg Val Ile Gln Ala Gly Gln Lys Ile	
380 385 390	
gat gag ccc act agc aac atg gac ala ttt cct aca gta gcc aag ctg	1433
Asp Glu Pro Thr Ser Asn Met Asp Ile Phe Pro Thr Val Ala Lys Leu	
395 400 405 410	

gct gga gct ccc ttg cct gag gac agg atc att gat gga cgt gat ctg 1481
 Ala Gly Ala Pro Leu Pro Glu Asp Arg Ile Ile Asp Gly Arg Asp Leu
 415 420 425

atg ccc ctg ctt gaa gga aaa agc caa cgc tcc gat cat gag ttt ctc 1529
 Met Pro Leu Leu Glu Gly Lys Ser Gln Arg Ser Asp His Glu Phe Leu
 430 435 440

ttc cat tac tgc aac gcc tac tta aat gct gtg cgc tgg cac cct cag 1577
 Phe His Tyr Cys Asn Ala Tyr Leu Asn Ala Val Arg Trp His Pro Gln
 445 450 455

aac agc aca tcc atc tgg aag gcc ttt ttc ttc acc ccc aac ttc aac 1625
 Asn Ser Thr Ser Ile Trp Lys Ala Phe Phe Phe Thr Pro Asn Phe Asn
 460 465 470

ccc gtg ggt tcc aac gga tgc ttt gcc aca cac gtg tgc ttc tgt ttc 1673
 Pro Val Gly Ser Asn Gly Cys Phe Ala Thr His Val Cys Phe Cys Phe
 475 480 485 490

ggg agt tat gtc acc cat cac gac cca cct tta ctc ttt gat att tcc 1721
 Gly Ser Tyr Val Thr His His Asp Pro Pro Leu Leu Phe Asp Ile Ser
 495 500 505

aaa gat ccc aga gag aga aac cca cta act cca gca tcc gag ccc cgg 1769
 Lys Asp Pro Arg Glu Arg Asn Pro Leu Thr Pro Ala Ser Glu Pro Arg
 510 515 520

ttt tat gaa atc ctc aaa gtc atg cag gaa gct gcg gac aga cac acc 1817
 Phe Tyr Glu Ile Leu Lys Val Met Gln Glu Ala Ala Asp Arg His Thr
 525 530 535

cag acc ctg cca gag gtg ccc gat cag ttt tca tgg aac aac ttt ctt 1865
 Gln Thr Leu Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Ser Trp Asn Asn Phe Leu
 540 545 550

tgg aag ccc tgg ctt cag ctg tgc tgt cct tcc acc ggc ctg tct tgc 1913
 Trp Lys Pro Trp Leu Gln Leu Cys Cys Pro Ser Thr Gly Leu Ser Cys
 555 560 565 570

cag tgt gat aga gaa aaa cag gat aag aga ctg agc cgc tagcagcgcc 1962
 Gln Cys Asp Arg Glu Lys Gln Asp Lys Arg Leu Ser Arg
 575 580

tggggaccag acagacgcat gttggcaaagc tcaccaatctt cactacaaac acgcctgaga 2022

giggcacitgg ggaaacataa ciccacatctac accttggati tggactgati ciccattttaa 2082

tcacctgaag gcttggggcca gagctcaaca gctactcaac tggaggggig agggggataa 2142

ggctctgtagt atacagacag gaagatggta ggtttatgcc ttctgtggcc agagtcttgg 2202

acicatggaa atagaatgaa tagaggggcca ttcaacaaggc acaccagtgc aagcagatga 2262

caaaaaggig cagaaggcaa tctttaaaca gaaagggtgca ggaggtacct taactcacc 2322

cicagcaaat acctatgtca acagtataag ttaccattta ctttataatc tgcagigatg 2382

caataaccag cataataaa 2401

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01546

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N9/99, C12N5/10, C12Q1/34, C12N15/55, G01N33/15 //
A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N9/99, C12N5/10, C12Q1/34, C12N15/55, G01N33/15,
A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), CA (STN), JICST File (JOIS),
DDBJ/EMBL/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 91/05794, A1 (City of Hope), 2 May, 1991 (02. 05. 91) & EP, 450048, A1 & JP, 4-502261, A	1-7
A	WO, 91/02085, A1 (Housey Gerard M.), 21 February, 1991 (21. 02. 91) & EP, 486619, A1 & JP, 5-503419, A & US, 5266464, A & US, 5688655, A	1-7
A	WO, 93/05396, A1 (Novo Nordisk A/S), 18 March, 1993 (18. 03. 93) & EP, 645016, A1 & JP, 7-504081, A	1-7
A	WO, 94/09116, A1 (Merck & Co., Inc.), 28 April, 1994 (28. 04. 94) & EP, 666906, A1 & JP, 8-502647, A	1-7
A	JP, 6-329551, A (Mitsubishi Kasei Corp.), 29 November, 1994 (29. 11. 94) & EP, 616032, A2 & US, 5837853, A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 April, 1999 (21. 04. 99)

Date of mailing of the international search report
11 May, 1999 (11. 05. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01546

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Biol. Chem., Vol. 264[23] (1989) Stein C. et al., "Cloning and expression of human steroid-sulfatase" p.13865-13872	8-10
A	J. Steroid Biochem Mol. Biol., Vol. 50[1/2] (1994) Purohit A. et al., "The Hydrolysis of Oestrone Sulphate and Dehydroepiandrosterone Sulphate by Human Steroid Sulphatase Expressed in Transfected COS-1 Cells" p.101-104	8-10
A	Nature Genetics, Vol. 13[1] (1996) Salido E.C. et al., "Cloning and expression of the mouse pseudoautosomal steroid sulphatase gene (Sts)" p.83-86	8-10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/01546

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/68, C12N9/99, C12N5/10, C12Q1/34, C12N15/55
G01N33/15//A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/68, C12N9/99, C12N5/10, C12Q1/34, C12N15/55
G01N33/15, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), CA (STN),
JICSTファイル (JOIS), DDBJ/EMBL/Genbank/PIR/SwissProt/Genseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 91/05794, A1 (シテイ・オブ・ホープ) 2. 5月. 1991 (02. 05. 91) &EP, 450048, A1&JP, 4-502261, A	1-7
A	WO, 91/02085, A1 (ハウジー, ジェラルド エム) 21. 2月. 1991 (21. 02. 91) &EP, 486619, A1&JP, 5-503419, A &US, 5266464, A&US, 5688655, A	1-7
A	WO, 93/05396, A1 (ノボ ノルディスク アクティ ーゼルスラブ) 18. 3月. 1993 (18. 03. 93) &EP, 645016, A1&JP, 7-504081, A	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区蔵が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 94/09116, A1 (メルク エンド カンパニー インコーポレーテッド) 28. 4月. 1994 (28. 04. 94) &EP, 666906, A1&JP, 8-502647, A	1-7
A	JP, 6-329551, A (三菱化成株式会社) 29. 11月. 1994 (29. 11. 94) &EP, 616032, A2 &US, 5837853, A	1-7
A	J. Biol. Chem., Vol. 264[23] (1989) Stein C. <i>et al.</i> 「Cloning and expression of human steroid-sulfatase」 p. 13865-13872	8-10
A	J. Steroid Biochem Mol. Biol., Vol. 50[1/2] (1994) Purohit A. <i>et al.</i> 「The Hydrolysis of Oestrone Sulphate and Dehydroepiandrosterone Sulphate by Human Steroid Sulphatase Expressed in Transfected COS-1 Cells」 p. 101-104	8-10
A	Nature Genetics, Vol. 13[1] (1996) Salido E. C. <i>et al.</i> 「Cloning and expression of the mouse pseudoautosomal steroid sulphatase gene (<i>Sts</i>)」 p. 93-86	8-10